二乙烯三胺/一氧化氮聚合物诱导的奶牛乳腺上皮细胞损伤模型的建立

郭咏梅　张博綦　石惠宇　闫素梅[1]　史彬林　郭晓宇

（内蒙古农业大学动物科学学院，呼和浩特 010018）

摘　要：泌乳期间的奶牛由于代谢旺盛，往往会产生大量一氧化氮（NO）,诱导发生氧化应激，进而对细胞产生毒害作用。本试验旨在探讨二乙烯三胺/一氧化氮聚合物（DETA/NO）诱导奶牛乳腺上皮细胞（bovine mammary epithelial cells，BMEC）氧化应激的损伤条件，并建立氧化应激模型。本试验利用不同浓度（0、10、30、100、500、1 000 μmol/L）的 DETA/NO 作为刺激源，作用 BMEC 2、4、6、8、12、24 h，通过测定细胞存活率、抗氧化指标、炎症因子和一氧化氮（nitric oxide，NO）含量及诱导型一氧化氮合酶（inducible nitric oxide synthase，iNOS）活性，筛选适宜的 DETA/NO 作用时间及作用浓度，建立 BMEC 氧化损伤模型。结果表明：1 000 μmol/L 的 DETA/NO 作用细胞 6 h，细胞存活率降低为 74.27%，超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶活性也均显著降低（$P<0.05$），然而，iNOS 活性，NO、白细胞介素-1、白细胞介素-6、肿瘤坏死因子-α、丙二醛含量则呈现相反的变化规律，显著升高（$P<0.05$）。综上所述，1 000 μmol/L 的 DETA/NO 处理细胞 6 h，可构建理想的 BMEC 氧化应激模型。

关键词：二乙烯三胺/一氧化氮聚合物；奶牛乳腺上皮细胞；氧化损伤

中图分类号：S823

氧化应激是指机体在需要清除体内老化的细胞或在遭受各种有害刺激时，体内高活性分子如活性氧自由基(reactive oxygen species，ROS)和活性氮自由基(reactive nitrogen species，RNS)产生过多，氧化程度超出机体对氧化物的清除能力，氧化系统与抗氧化系统失衡，使机体处于氧化应激状态，并最终导致组织损伤，引起疾病、衰老、甚至死亡。处于泌乳期的奶牛代谢旺盛，尤其在围产期和泌乳高峰期，由于机体产生较多的自由基而超过机体的防御能力，破坏蛋白质、核酸等生物大分子，使机体正常的代谢发生紊乱，即产生氧化应激[1]。奶牛乳腺上皮细胞（bovine mammary epithelial cells，BMEC）发生氧化应激不仅会影响健康，

收稿日期：2016-02-04

基金项目：国家自然科学基金项目（31560650）

作者简介：郭咏梅（1989—），女，内蒙古呼和浩特人，博士研究生，从事动物矿物质与维生素营养的研究。E-mail： ymguo2015@163.com

*通信作者：闫素梅，教授，博士生导师，E-mail： yansmimau@163.com

还会因为氧化产物的积累导致乳品质降低[2]。建立可靠的氧化应激模型,是揭示氧化应激机制的重要措施之一，对改善奶牛健康和改进乳品质也具有重要意义。

一氧化氮（nitric oxide，NO）是一种结构简单、分子质量小的生物自由基，研究证实，机体产生的 NO 具有双向调节功能。一方面，巨噬细胞产生的 NO 在体内和体外都有抗菌及抗肿瘤的作用，保护动物免除外界环境的感染[3]。另一方面，过高含量的 NO 还会导致活性氮的产生、细胞信号通路的阻断以及全身性不可控制的炎症，对机体产生氧化应激[4]。二乙烯三胺/一氧化氮聚合物（diethylenetriamine/nitric oxide adduct，DETA/NO)是一种人工合成的一氧化氮/核苷化合物，其特点在于它无需酶的催化作用，能够快速释放 NO。同时，DETA/NO 也是目前所获得的半衰期最长的一氧化氮/核苷化合物之一，有利于体外试验的长时程观察。因此，DETA/NO 是较为理想的诱导细胞损伤的外源性 NO 供体[5]。

然而，目前大多数细胞氧化损伤模型是以过氧化氢（H_2O_2）作为应激源构建的，关于以 DETA/NO 作为外源性 NO 供体构建细胞氧化损伤模型的报道鲜见，而针对 BMEC 构建 NO 损伤模型的研究尚未见报道。鉴于此，本试验采用 DETA/NO 作为外源性 NO 供体，摸索造成体外培养的 BMEC 氧化损伤的适宜作用浓度和作用时间，建立 DETA/NO 氧化损伤模型，为进一步深入探讨 BMEC 氧化应激机制及抗氧化机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

DMEM/F12（货号：12400-024）、胎牛血清（货号：10099-141）、胰岛素转铁蛋白溶液（货号：51500-056）、胰蛋白酶/乙二胺四乙酸（货号：25300054）、双抗（货号：15140-122）、胶原酶Ⅱ（货号：17101-015）、表皮生长因子（货号：E4127）、氢化可的松（货号：H0135）、催乳素（货号：L6520）、两性霉素 B（货号：AE437）、DETA/NO（货号：146724-94-9）购自美国 Sigma 公司；四甲基偶氮唑盐（MTT）、二甲基亚砜（DMSO）购自美国 Amresco 公司；磷酸盐缓冲液（PBS）购自美国 HyClone 公司。

1.2 试剂配制

DETA/NO 培养液的配制：取 10 mg DETA/NO 溶于 612.8 μL 的超纯水中，配制成浓度为 0.1 mol/L 的母液。再将 DETA/NO 母液按试验要求配制成不同浓度的 DETA/NO 贮备液（0、0.001、0.003、0.010、0.050、0.100 mol/L）。在试验开始前，用不同浓度的 DETA/NO

贮备液配制成含不同浓度 DETA/NO 的细胞培养液（0、10、30、100、500、1 000 μmol/L），保证各浓度培养液中加入的 DETA/NO 溶液体积相等，使细胞培养液中除 DETA/NO 浓度不同外，其他成分都相同。配制好的细胞培养液用 0.22 μm 的过滤器过滤除菌，每次换液时现配现用，并且避光保存。

1.3　BMEC 的制备

BMEC 培养参照王新朋等[6]研究中所用的胶原酶消化法。于内蒙古呼和浩特市北亚清真屠宰场挑选采集健康的奶牛乳腺组织，迅速带回实验室，去除乳腺外层组织，取数块深层组织放入含 3×双抗的 PBS 中，转入超净台中，依次经含有 3×双抗的 PBS 清洗 3 遍、75%酒精（30 s）清洗 1 遍、含有 1×双抗的 PBS 清洗 3 遍。在深层腺泡多的地方剪取约 1 mm^3 大小的组织块块装入 5 mL 离心管中，进一步充分剪碎后加入等体积的 0.5%胶原酶Ⅱ。置于 CO_2 恒温培养箱（37 ℃、5% CO_2）中消化 1 h，为使组织块充分消化，期间每隔 20 min 拿出离心管轻轻摇晃 1 次。乳腺组织消化液用 80 目的细胞滤网过滤，收集滤液于 15 mL 的离心管中，1 300 r/min 离心 5 min 后，弃上清。培养液重新悬浮细胞后接种于 25 cm^2 的培养瓶中，置于 CO_2 恒温培养箱中培养。待原代细胞的贴壁率达到 80%~90%时，纯化 BMEC 并进行传代。

本试验采用第 3 代传代细胞进行研究，细胞经荧光免疫细胞染色法鉴定为 BMEC[7]。连续培养到第 3 代时，将 BMEC 接种于 96 孔细胞培养板和 60 mm 细胞培养皿中，加入完全培养基（含 0.5%胰岛素转铁蛋白硒钠、1 μg/mL 氢化可的松、5 μg/mL 催乳素、10 ng/mL 表皮生长因子）培养至细胞贴壁率 80%~90%时，弃去旧培养基，加入无血清培养基饥饿培养 24 h，之后进行后续测定试验。

1.4　试验设计

该试验分为 2 部分。试验 1 采用单因子完全随机试验设计，将第 3 代贴壁生长的 BMEC 随机分为 36 个组，每组 6 个重复，组细胞培养基中分别添加 0、10、30、100、500、1 000 μmol/L 的 DETA/NO，使之分别作用 2、4、6、8、12 和 24 h。其中，0 μmol/L 为对照组。通过测定其对细胞存活率的影响，初步筛选 DETA/NO 适宜的作用时间。

试验 2 采用单因子随机试验设计，将第 3 代贴壁生长的 BMEC 随机分为 4 个组，每组 6 个重复，每组细胞培养基中分别添加 0、10、30、100、500、1 000 μmol/L 的 DETA/NO。

其中，0 μmol/L 为对照组。DETA/NO 作用时间以试验 1 筛选得出的时间为准，以抗氧化指标为依据，进一步筛选出适宜的 DETA/NO 作用浓度。

1.5　样品采集

细胞培养液的采集：BMEC 经不同浓度的 DETA/NO 培养基培养 6 h 后，以处理和重复为单位，分别收集细胞培养液于 1.5 mL Eppendorf 管中，12 000 r/min 离心 10 min，收集上清液用于超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化氢酶（CAT）、诱导型一氧化氮合酶（inducible nitric oxide synthase，iNOS）活性及 NO、白细胞介素-1（IL-1）、白细胞介素-6（IL-6）、肿瘤坏死因子-α（TNF-α）含量的测定。

细胞样品的采集：BMEC 经不同浓度的 DETA/NO 培养液培养 6 h 后，弃上清，将培养皿置于冰上，加入 1 mL PBS 清洗 2 遍，加入 1 mL 动物细胞裂解液冰上裂解 30 min，之后用细胞刮板刮取贴壁细胞，收集于到 1.5 mL Eppendorf 离心管中，4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min，收集上清液用于细胞中谷胱甘肽过氧化物酶（GPx）活性和丙二醛（MDA）含量的测定。

1.6　测定指标与方法

BMEC 存活率采用 MTT 法测定。将 BMEC 悬液接种于 96 孔培养板中，按照上述试验设计培养，向各培养孔中加入 20 μL 的 MTT（5 mg/mL）；培养 4 h 后，弃去上清液，甩板并拍干液体，再向每孔加入 100 μL DMSO，使用全自动酶标仪振荡 10 min 后，在 490 nm 波长下检测各孔吸光度值（$OD_{490\ nm}$）。吸光度值反映细胞的存活数量，吸光度值越高，说明细胞的存活数量越多。

细胞存活率（%）=（试验组 $OD_{490\ nm}$/对照组 $OD_{490\ nm}$）×100。

细胞培养液中 SOD 活性采用黄嘌呤氧化酶法测定，CAT 活性采用比色法测定。细胞中 GPx 活性采用二硫代二硝基苯甲酸法测定，MDA 含量采用硫代巴比妥酸法(TBA)测定，操作步骤按照试剂盒说明书进行。试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

细胞培养液中 iNOS 活性和 NO、炎症细胞因子（IL-1、IL-6、TNF-α）含量均采用双抗体夹心法测定，具体操作按照说明书进行。试剂盒购自美国 R&D 公司。

1.7　试验数据处理

本试验数据用 Excel 进行初步整理及计算，采用 SAS 9.0 统计软件中的 ANOVA 程序进

行单因素方差分析，并采用 Duncan 氏检验进行多重比较。

2 结 果

2.1 DETA/NO 作用浓度与作用时间对 BMEC 数量的影响

由表 1 可见，在不同的作用时间下，DETA/NO 的作用浓度对 BMEC 数量有显著的影响（P<0.05），随着 DETA/NO 浓度的增加，细胞数量呈不同程度的降低，当 DETA/NO 浓度为 10 μmol/L 时，作用时间为 2、4、6 h 时，DETA/NO 对细胞数量无显著影响（P>0.05），当作用时间延长到 8、12、24 h 时，与对照组相比，细胞数量显著减少（P<0.05），存活率分别为 95.32%、92.54%、88.98%。当 DETA/NO 浓度增加到 30~500 μmol/L 时，作用时间为 2~6 h 时，虽然细胞数量显著低于对照组（P<0.05），且细胞存活率均在 80%以上。当 DETA/NO 浓度增加到 1 000 μmol/L 时，所有作用时间的细胞数量均显著低于对照组及其他各浓度组（P<0.05）。

随着 DETA/NO 作用时间的延长，DETA/NO 各组的细胞数量均呈先降低又升高的趋势。与作用 2 h 相比，作用 4 h 的各组细胞数量均呈下降趋势，作用 6 h，所有浓度组细胞数量均增加；但作用时间在 6~24 h 时，除 500、1 000 μmol/L 外，其他浓度组的细胞数量波动较小。其中，细胞存活率在 70%~80%内的 DETA/NO 作用浓度与时间分别是：1 000 μmol/L DETA/NO 作用细胞 6 h，细胞存活率为 74.27%；500 μmol/L DETA/NO 作用细胞 8 h，细胞存活率为 78.94%；100 μmol/L DETA/NO 作用细胞 24 h，细胞存活率为 76.60%。

表 1 DETA/NO 作用浓度与作用时间对 BMEC 数量的影响（以 $OD_{490\ nm}$ 表示）

Table1 Effects of action concentration and time of DETA/NO on BMECs count （expressed as $OD_{490\ nm}$）

DETA/NO 浓度 Concentration of DETA/NO/(μmol/L)	作用时间 Action time/h					
	2	4	6	8	12	24
0	0.395[a]	0.381[a]	0.464[a]	0.474[a]	0.488[a]	0.517[a]
10	0.388[ab]	0.360[ab]	0.449[ab]	0.452[b]	0.451[b]	0.460[b]
30	0.381[bc]	0.353[bc]	0.435[bc]	0.429[c]	0.430[c]	0.419[c]
100	0.370[cd]	0.349[bc]	0.418[c]	0.408[d]	0.404[d]	0.396[d]
500	0.362[de]	0.334[c]	0.374[d]	0.374[e]	0.339[e]	0.315[e]
1 000	0.356[e]	0.306[d]	0.344[e]	0.302[f]	0.281[f]	0.255[f]

SEM	0.003 5	0.007 3	0.007 3	0.004 5	0.004 4	0.004 0
P 值 *P*-value	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1

同列数据肩标相同字母表示差异不显著（P＞0.05），不同字母表示差异显著（P＜0.05）。下表同。

Values in the same column with the same letter superscripts mean no significant difference (P＞0.05), while with different letter superscript mean significant difference (P＜0.05). The same as below.

2.2 DETA/NO 作用浓度对 BMEC 抗氧化指标的影响

由表 2 可见，DETA/NO 浓度对细胞 SOD 活性有显著的降低作用（P＜0.05）。与对照组相比，10、30 μmol/L 组 SOD 活性无显著差异（P＞0.05）。其中，浓度为 1 000 μmol/L 的组 SOD 活性最低，显著低于对照组和 10、30、100 μmol/L 组（P＜0.05），与 500 μmol/L 组相比，虽无显著差异（P＞0.05），但在数值上低于 500 μmol/L 组。随着 DETA/NO 浓度增大，细胞 CAT 活性也显著下降（P＜0.05）。与对照组相比，10 μmol/L 组 CAT 活性无显著变化（P＞0.05），其余各组均显著低于对照组（P＜0.05），其中，1 000 μmol/L 组最低。细胞 GPx 活性也呈现相似的变化规律，对照组 GPx 活性最高，且与 10 μmol/L 组组间差异不显著（P＞0.05）。当 DETA/NO 浓度增加到 30 μmol/L，GPx 活性显著低于对照组。1 000 μmol/L 组显著低于其他各组（P＜0.05）。细胞 MDA 含量则呈现与 GPx 活性相反的变化规律。与对照组相比，10 μmol/L 组无显著变化（P＞0.05），但随着 DETA/NO 浓度的进一步增加，MDA 含量逐渐升高。当 DETA/NO 浓度增加到 500~1 000 μmol/L 时，MDA 含量较高，显著高于其他组（P＜0.05）。500 与 1 000 μmol/L 组之间差异不显著（P＞0.05），但在数值上 1 000 μmol/L 组 MDA 含量高于 500 μmol/L 组。

表 2 DETA/NO 作用浓度对 BMEC 抗氧化指标的影响

Table 2 Effects of action concentration of DETA/NO on antioxidant parameters of BMECs

DETA/NO 浓度 Concentration of DETA/NO/(μmol/L)	超氧化物歧化酶 SOD/(IU/mL)	过氧化氢酶 CAT/(IU/mL)	谷胱甘肽过氧化物酶 GPx/(IU/mg prot)	丙二醛 MDA/(IU/mg prot)
0	15.11[a]	2.42[a]	154.56[a]	0.85[a]
10	15.06[a]	2.18[ab]	145.49[ab]	0.95[a]
30	14.38[a]	1.82[b]	137.73[bc]	1.53[b]

100	11.18^{b}	1.25^{c}	133.30^{c}	2.32^{c}
500	10.38^{bc}	0.99^{cd}	126.89^{c}	3.42^{d}
1 000	9.72^{c}	0.97^{d}	105.25^{d}	3.72^{d}
SEM	0.381 8	0.136 3	3.537 0	0.176 3
P 值 *P*-value	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1

2.2 DETA/NO 作用浓度对 BMEC 炎症因子含量的影响

由表 3 可见，随着 DETA/NO 浓度的增加，细胞 IL-1、IL-6、TNF 含量呈不同程度的升高趋势。与对照组相比，10 μmol/L 组的细胞 IL-6、TNF 含量在数值上有所提高，但组间差异不显著（*P*＞0.05）。细胞 IL-1 含量在 10 μmol/L 组、IL-6 和 TNF 含量在 30 μmol/L 组开始显著高于对照组（*P*＜0.05）。100、500 μmol/L 组的细胞 IL-1、TNF 含量组间差异显著（*P*＜0.05），同时显著高于对照组及 10、30 μmol/L 组（*P*＜0.05）。1 000 μmol/L 组的细胞 IL-1、IL-6、TNF 含量最高，显著高于对照组（*P*＜0.05），但与 500 μmol/L 组相比，无显著差异（*P*＞0.05）。BMEC 经不同浓度的 DETA/NO 处理后，细胞 iNOS 活性与 NO 含量变化规律相似。与对照组相比，10 μmol/L 的 DETA/NO 对 iNOS 活性与 NO 含量无显著影响（*P*＞0.05）。之后随着 DETA/NO 浓度的增加，iNOS 活性逐级显著升高，当浓度增加到 1 000 μmol/L 时，iNOS 活性达到最大值，显著高于其他各浓度组（*P*＜0.05）。NO 含量呈相似变化规律，100 与 500 μmol/L、500 与 1 000 μmol/L 组间差异均不显著（*P*＞0.05），但在数值上均随 DETA/NO 浓度的增加有所提高。

表 3 DETA/NO 作用浓度对 BMEC 炎症因子含量的影响

Table 3 Effects of action concentration of DETA/NO on inflammatory cytokine contents of BMECs

DETA/NO 浓度 Concentration of DETA/NO/(μmol/L)	诱导型一氧化氮合酶 iNOS/(U/mL)	一氧化氮 NO/(μmol/L)	白细胞介素-1 IL-1/(ng/L)	白细胞介素-6 IL-6/(ng/L)	肿瘤坏死因子 TNF/(ng/L)
0	10.4^{a}	58.4^{a}	66.9^{a}	21.9^{a}	133.5^{a}
10	11.3^{a}	61.0^{a}	71.4^{b}	23.7^{ab}	138.3^{ab}
30	12.2^{b}	62.4^{b}	78.9^{b}	24.9^{bc}	150.8^{b}
100	13.07^{c}	66.1^{c}	94.4^{c}	26.0^{cd}	161.5^{c}
500	14.0^{d}	70.0^{cd}	100.3^{d}	27.6^{de}	170.2^{d}

1 000	14.4[e]	71.2[d]	108.3[d]	28.5[e]	174.4[d]
SEM	0.227 4	1.141 5	2.142 6	0.637 7	3.025 9
P 值 *P*-value	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1

3 讨 论

NO 是细胞内和细胞间重要的信号调节分子,除了参与神经信息传递、机体防御免疫以及细胞凋亡等生理功能维系外，现代分子医学研究证明 NO 还与众多疾病的发生发展关系密切[8]。临床病理学研究显示一氧化氮合酶（*NOS*）的过表达、过量 NO 的产生和炎性介质的大量表达在各病理器官中呈明显相关性，这提示 NOS 及其合成的 NO 和次级产物活性氮等可引发炎症反应[9]。DETA/NO 是一种人工合成的一氧化氮/核苷化合物，其特点在于它无需酶的催化作用，能够快速释放 NO。同时，DETA/NO 也是目前所获得的半衰期最长的一氧化氮/核苷化合物之一，有利于体外试验的长时程观察，是较为理想的外源性 NO 供体[5]。因此，以 DETA/NO 为 NO 供体，诱导 BMEC 建立氧化损伤模型，可为科学调控奶牛乳腺抗氧化能力及机制研究提供了更好的试验平台。在关于氧化损伤模型的报道中，氧化应激判别标准也有所不同。在孙婧陶等[10]的报道中，建立延边奶山羊乳腺上皮细胞氧化损伤模型时，以细胞存活率为 50%~60%作为筛选 H_2O_2 适宜作用浓度与时间的评判标准。齐晓龙等[11]以细胞存活率 60%作为产蛋鸡肝细胞氧化损伤模型的评判标准。金鹿等[12]的研究指出，建立 H_2O_2 诱导的 BMEC 氧化损伤模型以细胞存活率 70%~80%作为标准进行 H_2O_2 的初步筛选。不同种类的细胞对于氧化损伤的耐受力不同，对于细胞存活率判别标准的选择也不同。

由本试验结果可以看出，浓度为 1 000 μmol/L 的 DETA/NO 作用细胞 6 h、浓度为 500 μmol/L 的 DETA/NO 作用细胞 8 h、浓度为 100 μmol/L 的 DETA/NO 作用细胞 24 h，细胞存活率都在 70%~80%，分别为 74.27%、78.94%、76.60%。结果显示，DETA/NO 作用 4 h 与 2 h 相比，细胞存活率均下降，但均在 80%以上。500~1 000 μmol/L 的 DETA/NO 作用细胞 8~12 h，除浓度为 500 μmol/L 的 DETA/NO 作用 8 h 之外，其余组均对细胞造成严重的氧化损伤，细胞存活率下降至 70%以下，最低达到 49.28%。浓度为 1 000 μmol/L 的 DETA/NO 作用细胞 6 h、浓度为 500 μmol/L 的 DETA/NO 作用细胞 8 h，细胞存活率虽然均下降到 70%~80%，但考虑到操作过程中的作用时间过长，将 BMEC 长时间暴露于高浓度的 DETA/NO，会造成细胞大量死亡，以及不可逆的细胞损伤，这不利于氧化损伤建模进行后续试验。因此，根据

细胞存活率初步确定：浓度为 1 000 μmol/L 的 DETA/NO 作用细胞 6 h 即可发挥适宜的氧化损伤作用，细胞存活率为 74.27%，符合筛选要求，并且可以在较短时间内观察到试验结果。

在正常生理情况下，自由基的产生和清除是处于动态平衡的。如果机体长时间处在病理状态下，体内产生大量自由基并在在体内蓄积不能及时被清除，就会对机体产生损伤。清除体内多余的自由基主要依赖于抗氧化损伤防御体系中的抗氧化酶,如 CAT、SOD、GPx 等，它们发挥着重要的抗氧化防御作用，可以直接清除体内的多余的 ROS，保护机体免受氧化损伤。MDA 是自由基，是检测脂质过氧化反应的重要指标，能反映出氧化应激的程度[13-14]。因此，抗氧化指标是反映细胞是否发生氧化应激损伤及其损伤程度关键指标，因此确定细胞氧化损伤模型时，除考虑细胞存活率外，还必须考虑这些指标。本试验结果得出，与对照组相比，当 DETA/NO 的作用时间为 6 h 时，作用浓度达到 100 μmol/L 即可引起 SOD、CAT、GPx 活性的显著降低，MDA 含量的显著增加，说明 DETA/NO 引起了细胞的氧化应激损伤。此外，程广东[15]的研究指出，当机体的抗氧化酶含量或活性升高时,机体往往也处于较高的免疫水平，表明氧化损伤与炎症关系密切。

如前所述，NO 是一种结构简单、分子质量小的生物自由基，它具有双向调节作用，高含量状态下，可以激活核转录因子 κB(NF-κB),诱导促炎症细胞因子 TNF-α、IL-1、IL-6 等的产生，IL-1、IL-6 和 TNF-α 的产生又能激活 iNOS，促使机体产生更多的 NO，从而形成正反馈循环，使细胞因子的分泌以及其 NO 自身的合成得以持续，使炎症反应更持久，更剧烈，并最终引起 DNA 损伤，线粒体呼吸抑制等。其中重要的机制之一是超氧负离子的伴随产生，两者可以形成过氧亚硝酸盐阴离子等活性氮，对重要蛋白进行氮化修饰，改变信号途径，直接和间接地介导了 NO 的细胞毒性效应[9,16-17]。因此，NO 与炎症因子 TNF-α、IL-1、IL-6 均可反映细胞的氧化应激程度。本试验中，不同浓度的 DETA/NO 处理细胞后，在 BMEC 抗氧化能力下降的同时，各组的炎症因子含量、NO 含量及 iNOS 的活性也呈现出与抗氧化酶活性相反的变化趋势；DETA/NO 作用浓度达到 30 μmol/L 即可引起活性氮 NO 和炎症因子 TNF-α、IL-1、IL-6 的显著增加，说明 DETA/NO 作用浓度达到 30 μmol/L 即可引起细胞不同程度的损伤。

建立氧化应激模型时，细胞存活率不宜过高或过低，既要引起足够的细胞损伤，同时还要考虑细胞存活率不可过低；若存活率过低，说明大量的细胞已经死亡，会造成细胞不可恢

复的损伤，不利于后续试验研究；若存活率过高，说明细胞的长势较好，细胞的活力也较好，氧化后不会造成明显的损伤，也不利于后续试验的开展[11]。金鹿等[12]研究指出，BMEC 存活率降低到 70%~80%为宜。在本研究条件下，1 000 μmol/L 组作用 6 h 不仅引起了细胞抗氧化能力的显著降低与炎症因子含量的显著升高，又使细胞存活率保持在 70%~80%。

综上所述，以 1 000 μmol/L 的 DETA/NO 作为刺激源，作用细胞 6 h，引起 BMEC 氧化损伤，这可以作为建立 BMEC 氧化损伤模型的适宜条件。

4 结 论

① 细胞存活率、抗氧化指标及炎症因子含量都可以作为判别 BMEC 是否发生氧化应激的重要指标。

② 经 1 000 μmol/L 的 DETA/NO 处理细胞 6 h 后，SOD、CAT、GPx 活性均显著降低，MDA、炎症因子及 NO 含量，iNOS 活性均显著上升，使 BMEC 产生明显的氧化应激。以 DETA/NO 为应激源，作用浓度为 1 000 μmol/L 作用时间为 6 h，可以作为建立 BMEC 氧化损伤模型的适宜条件。

参考文献:

[1] 刘建新,王艳明.奶牛氧化应激研究进展及其影响因素[J].饲料工业,2010(增刊):9–14.

[2] 王振云,周璇,李惠侠,等.茶多酚对氧化应激所致奶牛乳腺上皮细胞损伤的保护作用[J].南京农业大学学报,2012,35(3):101–106.

[3] MACMICKING J,XIE Q W,NATHAN C.Nitric oxide and macrophage function[J].Annual Review of Immunology,1997,15:323–350.

[4] SANG J R,JIANG M Y,LIN F,et al.Nitric oxide reduces hydrogen peroxide accumulation involved in water stress-induced subcellular anti-oxidant defense in maize plants[J].Journal of Integrative Plant Biology,2008,50(2):231–243.

[5] KEEFER L K,NIMS R W,DAVIES K M,et al.“NONOates”(1-substituted diazen-1-ium-1,2-diolates) as nitric oxide donors:convenient nitric oxide dosage forms[J].Methods in Enzymology,1996,268:281–293.

[6] 王新朋,闫素梅,齐利枝,等.β-羟丁酸浓度对奶牛乳腺上皮细胞内乳蛋白合成相关基因表达量的影响[J].动物营养学报,2014,26(12):3836–3842.

[7] PETKOV S G,MARKS H,KLEIN T,et al.*In vitro* culture and characterization of putative porcine embryonic germ cells derived from domestic breeds and Yucatan mini pig embryos at Days 20–24 of gestation[J].Stem Cell Research,2011,6(3):226–237.

[8] BIAN K,MURAD F.Nitric oxide (NO)-biogeneration,regulation,and relevance to human diseases[J].Frontiers in Bioscience,2002,8:d264-d278.

[9] 章丹丹,刘俊,MURAD F,等.诱导型一氧化氮合酶与疾病[J].现代生物医学进展,2007,7(10):1571–1573,1577.

[10] 孙婧陶,李兆华,张宝修,等.过氧化氢诱导延边奶山羊乳腺上皮细胞氧化损伤模型的建立[J].江苏农业科学,2013,41(10):149–152.

[11] 齐晓龙,赵芹,张亚男,等.过氧化氢诱导产蛋鸡原代肝细胞氧化应激模型的建立[J].中国畜牧杂志,2013,49(11):49–52.

[12] 金鹿,闫素梅,史彬林,等.过氧化氢诱导的奶牛乳腺上皮细胞氧化损伤模型的建立[J].动物营养学报,2014,26(12):3651–3658.

[13] 袁施彬.仔猪氧化应激及硒的抗应激效应和机理的研究[D].博士学位论文.雅安:四川农业大学,2007.

[14] 李忠鹏.奶牛肢蹄病患牛体内矿物元素和氧化应激指标的变化[D].硕士学位论文.泰安:山东农业大学,2014.

[15] 程广东.连翘酯苷 A 对鸡脾和血中炎症细胞因子及抗氧化性能影响[D].博士学位论文.哈尔滨:东北农业大学,2014.

[16] 范精华,刘康,刘保林.NO 在炎症及免疫应答中的调节作用[J].中外医疗,2009,28(25):163,166.

[17] BIAN K,KE Y,KAMISAKI Y,et al.Proteomic modification by nitric oxide[J].Journal of Pharmacological Sciences,2006,101(4):271–279.

Establishment of Oxidative Damage Model of Bovine Mammary Epithelial Cells Induced by Diethylenetriamine/Nitric Oxide Adduct

GUO Yongmei　ZHANG Boqi　SHI Huiyu　YAN Sumei*　SHI Binlin　GUO Xiaoyu

*Corresponding author, professor, E-mail:yansmimau@163.com

（责任编辑　王智航）

(*College of Animal Science, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot* 010018, *China*)

Abstract: Due to exuberant metabolism, dairy cows produce a great deal of nitric oxide (NO）during lactation, which leads to oxidative stress, and then results in cell toxicity. This experiment was conducted to investigate the suitable condition for oxidative damage model of bovine mammary epithelial cells (BMEC) induced by diethylenetriamine/nitric oxide adduct (DETA/NO) and establish an oxidative damage model. The oxidative damage model of BMEC was established using DETA/NO as the stimulation source. BMEC was exposed in DETA/NO with different medium concentrations (0, 10, 30, 100, 500 and 1 000 μmol/L) and for different times (2, 4, 6, 8, 12 and 24 h). According to the analysis of cell survival rate and antioxidative parameters, inflammatory cytokines and nitric oxide (NO) contents, as well as inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity, the suitable treatment time and concentration of DETA/NO were screened. The results showed that the survival rate decreased to 74.27%, and the activitise of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase also significantly reduced (P<0.05) after that BMEC was cultured with 1 000 μmol/L DETA/NO for 6 h. However, the activity of iNOS and the contents of NO, interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor–α and malondialdehyde showed opposite changes and increased significantly (P<0.05). In summary, the treatment of 1 000 μmol/L DETA/NO for 6 h is suitable for establishment of oxidative damage model.

Key words: diethylenetriamine/nitric oxide adduct; bovine mammary epithelial cell; oxidative damage